

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2912413号

(45) 発行日 平成11年(1999) 6月28日

(24) 登録日 平成11年(1999) 4月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
G 0 1 N 15/02		G 0 1 N 15/02	C
15/14		15/14	K
			C
33/543	5 8 1	33/543	5 8 1 L
	5 8 7		5 8 7
請求項の数 1 (全 10 頁)			
(21) 出願番号	特願平2-81749	(73) 特許権者	999999999
(22) 出願日	平成2年(1990) 3月28日		東亜医用電子株式会社
(65) 公開番号	特開平3-279842		兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番
(43) 公開日	平成3年(1991) 12月11日	(72) 発明者	古佐小 達也
審査請求日	平成9年(1997) 2月7日		兵庫県明石市二見町西二見2001番18号
			土山駅前スカイハイツC-1117号
		(74) 代理人	弁理士 宮井 暎夫
		審査官	野村 伸雄
		(56) 参考文献	特開 昭63-247644 (J P, A)
			特開 平1-229936 (J P, A)
		(58) 調査した分野(Int.Cl. ⁶ , D B名)	
			G01N 15/00 - 15/14
			G01N 33/543
			J I C S T (J O I S)

(54) 【発明の名称】 粒度分布作成方法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 特定の領域にのみ対象粒子が分布し全領域または一部領域に対象外粒子が分布している粒度分布から対象粒子の粒度分布を作成する粒度分布作成方法にて、

前記特定の領域以外の領域の対象外粒子のデータから全領域の対象外粒子の粒度分布を推定し、この推定した対象外粒子の粒度分布を全体の粒度分布から差し引くことにより、対象粒子の粒度分布を作成することを特徴とする粒度分布作成方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

この発明は、抗原抗体反応を利用した免疫測定法等において好適に用いられる粒度分布作成方法に関するものである。

2

【従来の技術】

従来から癌等の病気の診断や経過観察のために抗原と抗体とが結合する抗原抗体反応を利用して腫瘍の指標となるマーカーを測定するRIA法（ラジオイムノアッセイ法）やEIA法（エンザイムイムノアッセイ法）の免疫測定法が行われている。これらの免疫測定法は、測定時間が長時間必要である。また、測定を行った後の検体の廃棄処理方法が難しい等の問題があった。

そこで、同様に抗原抗体反応を利用して血清等の検体に含まれる微量蛋白質等の抗原（または抗体）の濃度を高感度かつ迅速に測定するCIA法（Counting Immunoassay法）が提案されている。

この抗体抗原反応を利用したCIA法の一例を説明する。

測定すべき抗原を含む検体とこの抗原と特異的に反応

する抗体を感作した不溶性担体（例えば、ミクロン単位
のラテックス粒子）とを混合することにより、抗原抗体
反応で不溶性担体同士が凝集した凝集粒子を生成する。
この不溶性担体の粒子数および凝集度を粒子計数手段に
より測定して抗原の濃度を調べるものである。

凝集度を解析して抗原濃度を表示する濃度解析手段の
ブロック図を第6図に示す。

混合液中の未凝集粒子および凝集粒子は、検出器11で
その個々の粒子の大きさに対応した電気信号に変換され
る。そして、その電気信号は増幅器12で増幅され、A/D
変換器13でA/D変換された後、粒度分布変換装置14で凝
集粒子の粒度分布を得、粒子の凝集度が求められる。こ
の凝集粒子が、濃度変換装置15で抗原の濃度に変換され
て出力装置16に表示される。

第7図は、抗体抗原反応により抗原を含む検体と不溶
性担体との混合液中で凝集した不溶性担体の粒度分布の
一例を示す粒度分布図である。

横軸は不溶性担体の粒子径（相対粒子径）、縦軸は不
溶性担体の粒子数（相対粒子個数）を示し、領域F1は未
凝集の不溶性担体の粒子、領域F2は不溶性担体が2個凝
集した凝集粒子、領域F3は不溶性担体が3個凝集した凝
集粒子の分布領域である。

また、不溶性担体の凝集度Aは、特開昭60-111963号
公報、特開平1-259257号公報に提案されているように
 $A = P / (M + P) = P / T$
と定義する。ただし、Mは未凝集の不溶性担体の数、Pは
凝集粒子の数、Tは総粒子の数である。また、P、Mの各値
は、粒度分布を分画することにより得られる。

しかし、このCIA法は、測定しようとする検体中に乳
び粒子や不要な細胞等の対象外粒子が存在すると、対象
粒子として測定される不溶性担体の粒度分布図に対象外
粒子の分布が表れる。対象外粒子が粒度分布の領域全般
に広く分布していれば、未凝集の不溶性担体の粒子径より
小さい領域I1、未凝集の不溶性担体の領域F1と不溶性
担体が2個凝集した粒子径に対応する領域F2との間の領
域I2、不溶性担体が2個凝集した粒子径に対応する領域
F2と不溶性担体が3個凝集した粒子径に対応する領域F3
との間の領域I3、不溶性担体が3個凝集した粒子径に対
応する領域F3より大きい粒子径の領域I4の本来対象粒子
が存在しない領域に粒度が表れる。このように対象外粒
子が存在すると混合液中の対象粒子のみの粒度分布が得
られず、未凝集粒子と凝集粒子との算出に誤差がでる。
その結果、正確な凝集度および抗原濃度が求められな
い。そこで、この対象外粒子の乳び粒子や不要な細胞等
を除去するために検体の前処理が行われる。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、この対象外粒子となる乳び粒子や不要
な細胞等を除去するためには、遠心分離、ろ過または化
学的処理等の前処理を行って除去しなければならず、測
定に要する手間と時間が多く必要になるという問題を有

していた。

この発明の目的は、測定誤差の原因となる対象外粒子
が測定しようとする検体中に混在していても前処理を行
うことなく、対象とする粒子の正確な粒度分布を得ること
のできる粒度分布測定方法を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

この発明の粒度分布作成方法は、特定の領域にのみ対
象粒子が分布し全領域または一部の領域に対象外粒子が
分布している粒度分布から対象粒子の粒度分布を作成す
る粒度分布作成方法において、

前記特定の領域以外の領域の対象外粒子のデータから
全領域の対象外粒子の粒度分布を推定し、この推定した
対象外粒子の粒度分布を全体の粒度分布から差し引くこ
とにより、対象粒子の粒度分布を作成することの特徴と
するものである。

実際の検体中の抗原な測定においては、第7図に示す
ように対象となる未凝集の不溶性担体および不溶性担体
同士が凝集した粒子の粒度分布（領域F1、F2、F3）と、乳
び粒子や不要な細胞等の対象外粒子の粒度分布とが混在
する全粒子の粒度分布が得られるので、領域I1、I2、I3、I
4に顕著に表れている対象外粒子の粒度分布からさらに
広い領域に亘って存在する対象外粒子の粒度分布をスプ
ライン関数で補間して推定し、全粒子の粒度分布から対
象外粒子の粒度分布を差し引くことにより、対象粒子の
みの粒度分布を得ることができる。なお、対象外粒子の
粒度分布を補間する関数として、得られる関数曲線が良
好な近似を行うことのできるスプライン関数としたが、
特に限定するものではなく他の関数を用いて対象外粒子
の粒度分布を補間してもよい。

第1図は抗原（または抗体）を含む検体と抗体（また
は抗原）を感作させた不溶性担体とを混合し、対象粒子
と対象外粒子とが混雑する粒度分布から対象粒子のみの
粒度分布を得るために行う粒度分布変換処理を示すフロ
ーチャートである。

手順1:対象粒子と対象外粒子とが混在する粒度分布の
データを蓄積したメモリ（255チャンネル）から各粒子
の大きさに対応する測定値を順次読み取る。

手順2:読み取られた各測定値をスムージング処理して
平滑化を行い統計的変動による誤差を無くしてデータと
する。

手順3:スムージング処理して平滑化したデータから領
域F1に対応する未凝集の不溶性担体の分布のピーク位置
を検出する。この領域F1のピーク位置を元に対象外粒子
の各分布領域I1、I2、I3、I4を決定する。

手順4:領域I1、I2、I3、I4の対象外粒子の粒度分布を
得、標本データとする。

手順5:標本データに基づいて、全領域の対象外粒子の
粒度分布を3次のスプライン関数で補間して推定する。

手順6:対象外粒子の粒度分布を含む粒度分布から手順
5で推定した対象外粒子の粒度分布を差し引き対象粒子

の粒度分布のみを近似した補正データを得る。

手順7:補正データの粒度分布から凝集粒子数Pと総粒子数Tとを求め、凝集度Aを前述の計算式 ($A = P/T$) で算出する。

つぎに、標本データの求め方について説明する。

① 領域I1 (チャンネル数の一例として5)

未凝集の不溶性担体の粒子よりも小さい粒子径の粒子の領域であり、読み取られるデータの数は5チャンネル程度が良好である。なお、読み取られた総粒子数が所定値に満たない場合は、領域I1の標本データの値を0とし、所定値以上の場合はその数値をそのまま標本データとした。このことは、読み取られる粒子の数が所定値より少ないときに、その値を領域I1の標本データとすると関数による近似を行う際にばらつきが大きくなり、良好な近似ができなくなるからである。また、領域I1の標本データを0としても凝集度Aの算出への影響はほとんどない。

② 領域I2 (チャンネル数の一例として10)

未凝集の不溶性担体の粒子よりも大きい粒子径の粒子と、不溶性担体が2個凝集した粒子径よりも小さい粒子との間の領域であり、チャンネル数は10程度が良好である。なお、標本データは各チャンネルの粒子数からそれぞれ所定値を引いた値とした。このことは、正常な粒度分布でも微量であるが対象粒子成分が含まれる場合があり近似する補正データの引き過ぎや補正データの無用な振動 (分布曲線のがたつき) を無くするためである。

③ 領域I3 (チャンネル数の一例として20)

不溶性担体が2個凝集した粒子径よりも大きい粒子と、不溶性担体が3個凝集した粒子径よりも小さい粒子との間の領域であり、チャンネル数は20程度が良好である。この領域I3においても、微量の対象粒子成分が含まれる場合があるので、標本データの粒子数が所定数に満たない場合は標本データの値を0とする。

④ 流域I4 (チャンネル数の一例として20)

不溶性担体が3個凝集した粒子径よりも大きい粒子と、不溶性担体が4個凝集した粒子径よりも小さい粒子との間の領域であり、チャンネル数は20程度が良好である。この領域I4においても粒子数が所定数に満たない場合は、標本データの値を0とする。

以上の対象外粒子の各標本データを用いて3次のスプライン関数で全領域の対象外粒子の粒度分布曲線を推定する。そして、領域I1の中で最も小さい粒子径に対応するチャンネルをK1、領域I2と領域I2の中間のチャンネルをK2、領域I2の中で最も大きい粒子径に対応するチャンネルをK3、領域I3の中で最も大きい粒子径に対応するチャンネルをK4、領域I4の中で最も大きい粒子径に対応するチャンネルK6より1チャンネル下のチャンネルをK5とした。

なお、チャンネルK6は、領域I4の粒子よりも大きな粒子径の乳び粒子、比較的長い時間経過した後生成する

不溶性担体が4個以上凝集した対象粒子が全て蓄積されるチャンネルである。このチャンネルK6の粒子数は前述の関数により推定するのが困難であるので、チャンネルK6の粒子数を推定するためには検体と不溶性担体とを混合し、抗原抗体反応が進み不溶性担体が4個以上凝集して粒子径の大きい凝集粒子が生成されるまでの比較的早い時刻に、乳び粒子や不要な細胞等の粒子数を測定し、その測定値をチャンネルK6の対象外粒子の数とする。

このように、対象外粒子の領域I1、I2、I3、I4および節点とするチャンネルK1~K5を決定し、スプライン関数で対象外粒子の粒度分布を補間して推定した後、全領域の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引くことにより、対象粒子のみを近似した粒度分布の補正データを得ることができる。

【実施例】

実施例1

この実施例は、粒度分布の全領域に亘り対象外粒子の分布が大きく影響した例である。

従来と同様に、検査対象の抗原を含む検体となる血清の10 μ lに抗体を感作して得られた不溶性担体の溶液10 μ lと反応緩衝液80 μ lとを混合して15分間攪拌しながら凝集粒子を生成させる。そして、その凝集粒子の粒子数を粒子計数手段で粒子径ごとに測定し、その測定値から前述した手順1~4を行い第2図(a)の分布曲線G1に示すような粒度分布を得た。この分布曲線G1は、対象粒子と対象外粒子とが混合する分布を示す曲線であり、対象粒子のみの分布を正確に表すものではない。そこで、対象外粒子が存在する粒子径の領域I1~I4 (第7図)に対応する粒度分布の値から前述の手順5で対象外粒子の粒度分布をスプライン関数により推定して一点鎖線で示す分布曲線G2とした。そして、手順6として対象粒子と対象外粒子とが混在する粒度分布の標本データの分布曲線G1から、手順5で推定した対象外粒子の分布曲線G2を差し引き第2図(b)に示す補正データつまり対象粒子のみを近似した分布曲線G3を得、この分布曲線G3の値で、凝集粒子数P、総粒子数Tおよび凝集度Aを算出した。

その結果、対象粒子と対象外粒子が混在する標本データの分布曲線G1においては、凝集度Aが4.79%、検体 (血清) 単位容積当たりの α -フェトプロテイン濃度 (以下、AFP濃度と略す) が19.23ng/mlであったものが、対象粒子のみを近似した補正データ分布曲線G3では、凝集度Aが1.08%、検体 (血清) 単位容積当たりのAFP濃度が2.70ng/mlの計算値を得た。

実施例2

この実施例は粒度分布の全領域で対象外粒子の影響がほとんどない例である。

前述の実施例1と同様に、検査対象の抗原を含む検体となる血清10 μ lに抗体を感作して得られた不溶性担体の溶液10 μ lと反応緩衝液80 μ lとを混合して15分間攪

拌しながら凝集粒子を生成させる。そして、実施例 1 と同様にしてその凝集粒子の粒子数を粒子計数手段で粒子径ごとに測定し、その測定値から第 3 図 (a) に示す対象粒子と対象外粒子とが混在する凝集粒子の分布曲線 G4 を得た。つぎに、対象外粒子が存在する粒子径の領域 I1 ~ I4 に対応する粒度分布の値から対象外粒子の粒度分布をスプライン関数で推定した (図示せず)。そして、対象粒子と対象外粒子とが混在する粒度分布の標本データの分布曲線 G4 から、推定した対象外粒子の分布曲線を差し引き第 3 図 (b) に示す補正データつまり対象粒子のみを近似した分布曲線 G5 を得、この分布曲線 G5 の値で凝集粒子数 P、総粒子数 T および凝集度 A を算出した。

その結果、対象粒子と対象外粒子が混在する標本データの分布曲線 G4 においては、凝集度 A が 1.08%、検体 (血清) 単位容積当たりの AFP 濃度が 2.70 ng/ml であったものが、対象粒子のみを近似した補正データの分布曲線 G5 では、凝集度 A が 1.07%、検体 (血清) 単位容積当たりの AFP 濃度が 2.68 ng/ml の計算値を得た。

このように、粒度分布の全領域に亘って対象外粒子の分布が存在し、対象粒子の分布状態に影響が有る場合はもちろんのこと、粒度分布の全領域で対象外粒子の影響がほとんどない場合でも、対象粒子と対象外粒子とが混在する粒度分布から対象外粒子の粒度分布を補間して推定し、全体の粒度分布からその粒度分布を差し引くことにより、対象粒子のみの粒度分布を近似し、凝集度および検体中の AFP 濃度を正確に測定することができる。

つぎに、複数の異なる検体 (検体数 $n = 33$) で従来のように対象粒子と対象外粒子とが存在する粒度分布から測定・算出した AFP 濃度と、実施例 1, 2 と同様にして全体の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引いた対象粒子のみの粒度分布から測定・算出した AFP 濃度とをそれぞれ真の AFP 濃度と比較した相関関係を第 4 図 (a)、

(b) に示す。また、検体のガン胎児性抗原濃度 (以下、CEA の濃度と略す) についても同様に、従来のように対象粒子と対象外粒子とが存在する粒度分布から測定・算出した CEA 濃度と、全体の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引いた対象粒子のみの粒度分布から測定・算出した CEA 濃度とをそれぞれ真の CEA 濃度と比較した相関関係を第 5 図 (a)、(b) に示す。なお、各検体における真の AFP 濃度および真の CEA 濃度は、同じ検体 (検体数 = 33) を前処理として遠心分離し、フィルタでろ過して対象外粒子を除去した後、対象粒子の粒度分布を得、測定・算出した値とした。

第 4 図 (a)、(b) の各横軸は、真の AFP 濃度であり、第 4 図 (a) の縦軸は従来の方法により測定・算出した AFP 濃度、第 4 図 (b) の縦軸は前述の実施例と同じ方法すなわち全体の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引いた対象粒子のみの粒度分布から測定・算出した AFP 濃度である。

このように、従来の方法つまり対象粒子と対象外粒子

とか混在する粒度分布から AFP 濃度を測定・算出した各検体の相関関係は悪く、特に算出結果 22, 24 は第 4 図 (a) に示すように乳び粒子の影響で相関直線から大きく外れるとともに、その相関係数は 0.408 となる。これに対し、全体の粒度分布から対象外粒子な粒度分布を差し引いた対象粒子のみの粒度分布から AFP 濃度を測定・算出した各検体の相関関係は相関直線付近に集まり、相関係数 0.964 と大幅に向上し、真の AFP 濃度とほぼ同等の相関関係である。

第 5 図 (a)、(b) の各横軸は、真の CEA 濃度であり、第 5 図 (a) の縦軸は従来の方法により測定・算出した CEA 濃度、第 5 図 (b) の縦軸は前述の実施例と同じ方法すなわち全体の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引いた対象粒子のみの粒度分布から測定・算出した CEA 濃度である。

このように、CEA 濃度の場合においても、従来の方法つまり対象粒子と対象外粒子とが存在する粒度分布から CEA 濃度を測定・算出した各検体の相関関係の相関係数は 0.824 となるのに対し、全体の粒度分布から対象外粒子の粒度分布を差し引いた対象粒子の粒度分布から CEA 濃度を測定・算出した各検体の相関関係は相関直線付近に集まり、相関係数は 0.992 と向上し、真の CEA 濃度とほぼ同等の相関関係である。

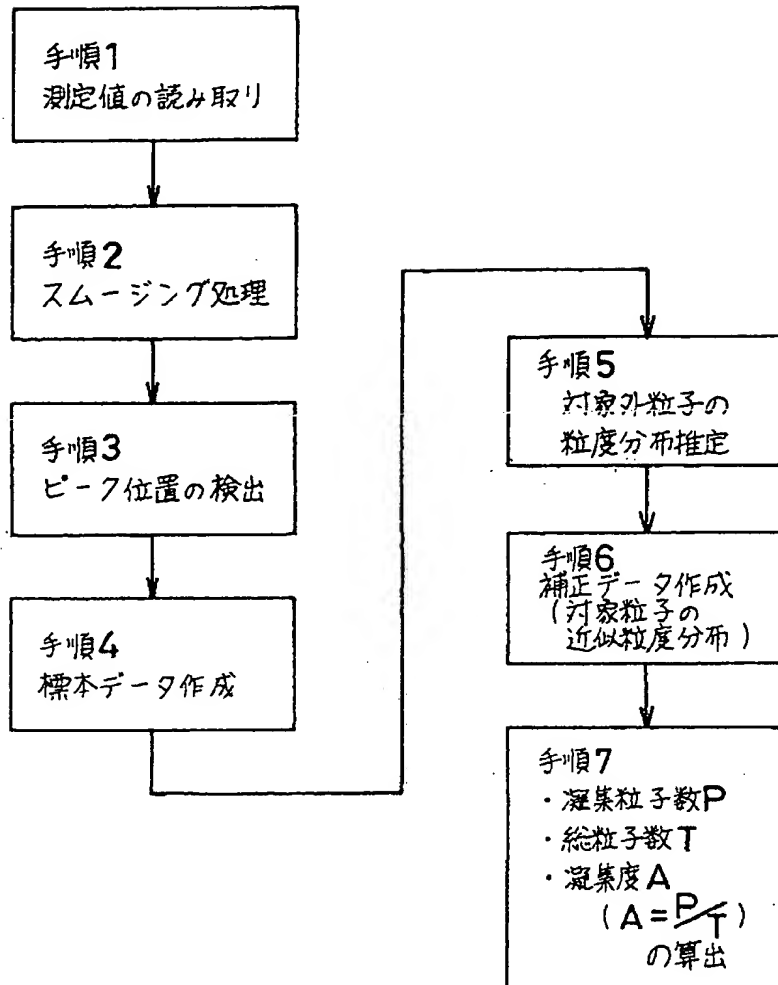
【発明の効果】

この発明の粒度分布作成方法は、特定の領域以外の領域の対象外粒子のデータから全領域の対象外粒子の粒度分布を推定し、この推定した対象外粒子粒度分布を全体の粒度分布から差し引いて対象粒子のみの粒度分布を測定することができるので、対象粒子と対象外粒子とが混在していても特別な前処理を行うことなく対象粒子の正確な粒度分布を得ることができる。

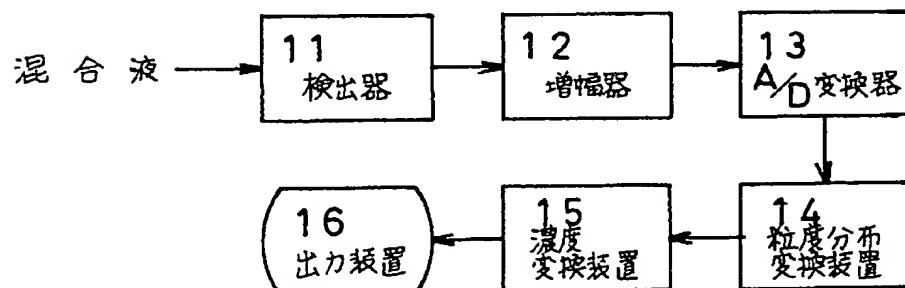
【図面の簡単な説明】

第 1 図はこの発明の粒度分布作成方法の実施例の粒度分布変換処理のフローチャート、第 2 図 (a) は実施例 1 の全領域の凝集粒子と対象外粒子との分布図、第 2 図 (b) はその対象粒子のみの分布図、第 3 図 (a) は実施例 2 の全領域の凝集粒子と対象外粒子との分布図、第 3 図 (b) はその対象粒子のみの分布図、第 4 図 (a) は従来の方法により算出した AFP 濃度と真の AFP 濃度との相関図、第 4 図 (b) は実施例の方法により算出した AFP 濃度と真の AFP 濃度との相関図、第 5 図 (a) は従来の方法により算出した CEA 濃度と真の CEA 濃度との相関図、第 5 図 (b) は実施例の方法により算出した CEA 濃度と真の CEA 濃度との相関図、第 6 図はその濃度解析手段のブロック図、第 7 図はその一例の粒度分布図である。
F1 ~ F3 …… (対象粒子の) 領域、I1 ~ I4 …… (対象外粒子の) 標本領域、G1, G4 …… (対象粒子と対象外粒子とが混在する) 分布曲線、G2 …… (推定対象外粒子の) 分布曲線、G3, G5 …… (対象粒子の) 分布曲線

【第1図】

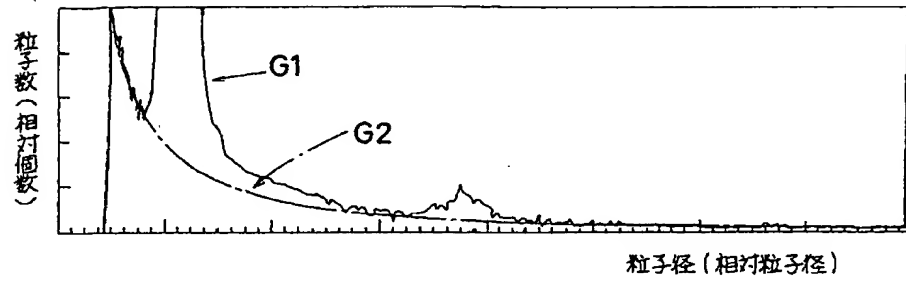


【第6図】

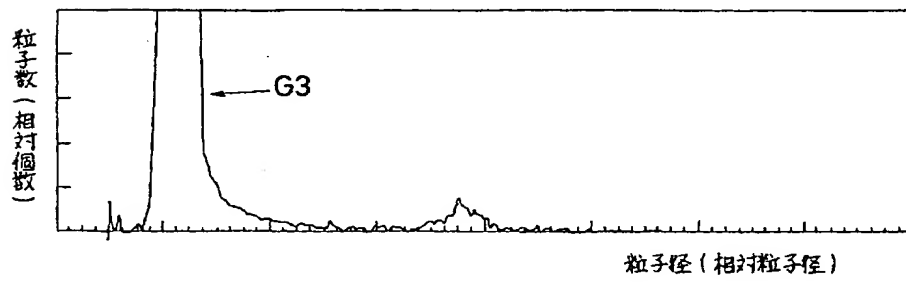


【第2図】

(a)

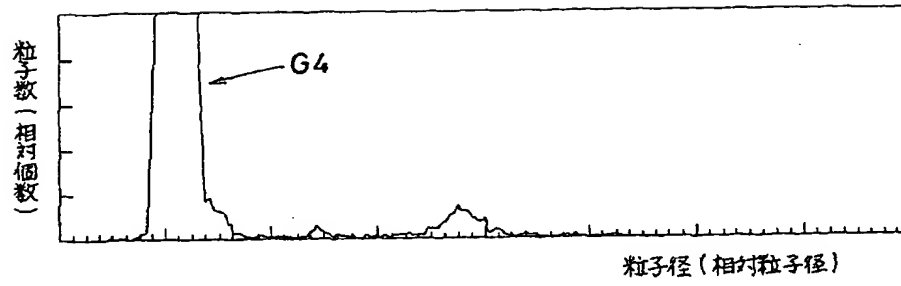


(b)

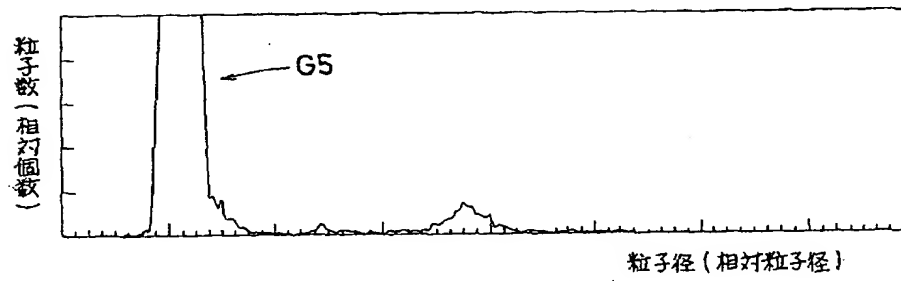


【第3図】

(a)

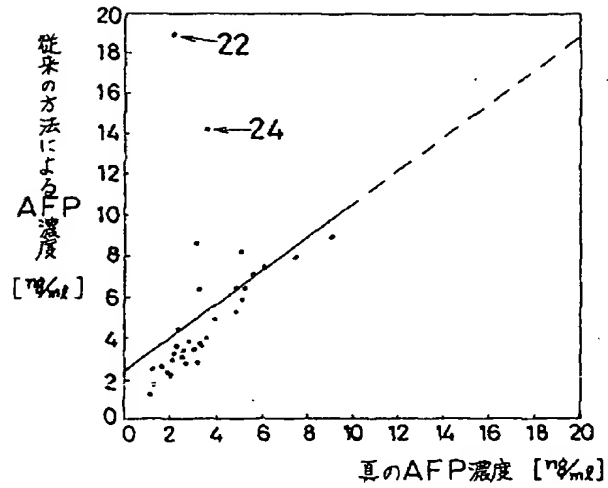


(b)

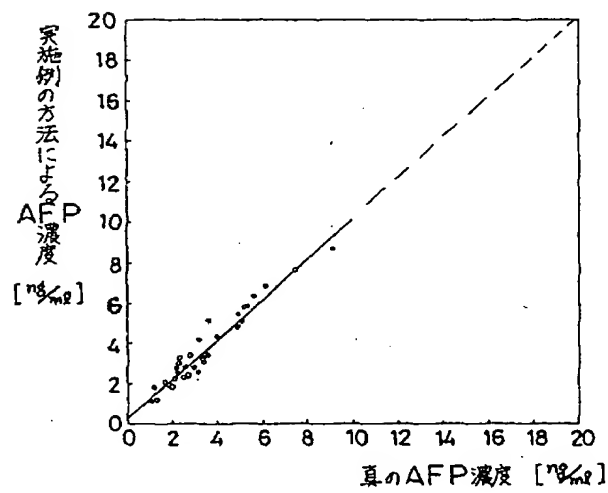


【第4図】

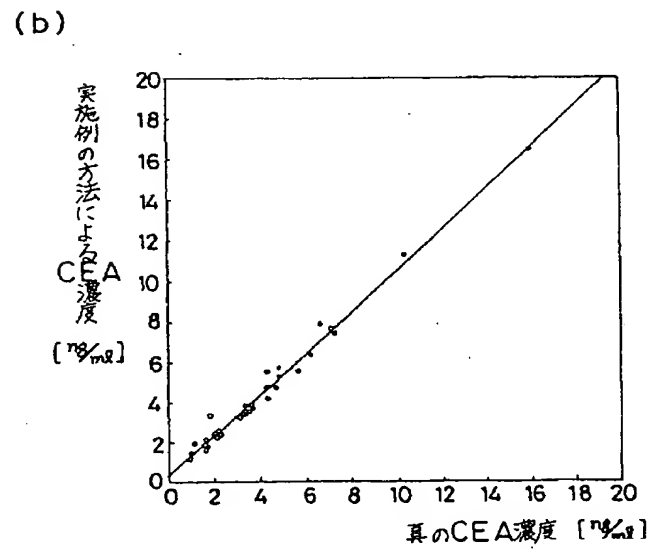
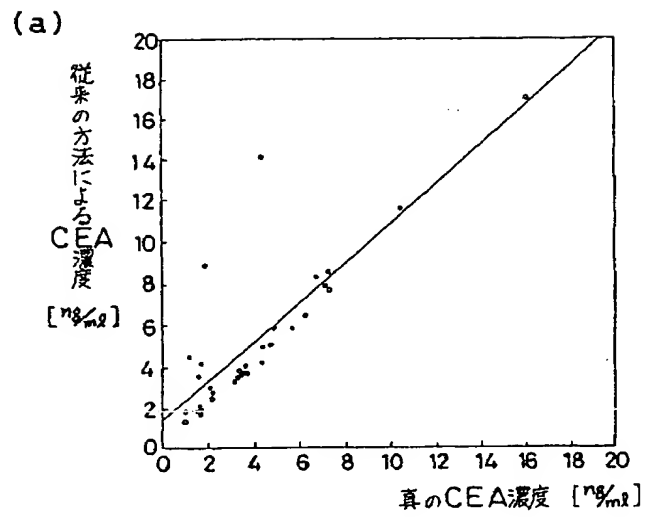
(a)



(b)



【第5図】



【第7図】

